



**Universitat de Lleida**

**Facultat de Medicina**

**Grau en Nutrició Humana i Dietètica**

# **Estudi metabòlic i nutricional de ratolins knockout per a Sprouty1 i el seu efecte en el metabolisme glucídic**

**Meritxell Martín Garí**

**Curs 2014/2015**



# **Estudi metabòlic i nutricional de ratolins knockout per a Sprouty1 i el seu efecte en el metabolisme glucídic**

**Treball final de grau presentat per:** Meritxell Martín Garí

**Tutoritzat per:**

Jose Serrano Casasola



# Index:

<b>1. RESUM.....</b>	<b>7</b>
<b>2. ANTECEDENTS .....</b>	<b>13</b>
2.1. CÀNCER I METABOLISME	13
2.2. AVALUACIÓ NUTRICIONAL	14
2.3. METABOLISME ENERGÈTIC	15
2.3.1. El metabolisme lipídic.	15
2.3.2. El metabolisme proteic.	16
2.3.3. El metabolisme glucídic	16
2.3.3.1. Insulina	17
2.3.3.2. Resistència a la insulina	18
2.4. MODEL EXPERIMENTAL PER L'ESTUDI:	20
2.4.1. Sprouty	20
2.4.1.1. Sprouty 1	20
<b>3. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS .....</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIALS I MÈTODES: .....</b>	<b>23</b>
4.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ:	23
4.2. INGESTA I EVOLUCIÓ DEL PES:	24
4.3. CORBES DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA	24
4.4. IMMUNODETECCIÓ PER WESTERN BLOT:	24
4.4.1. Obtenció de les proteïnes	24
4.4.2. Quantificació de les proteïnes	25
4.4.3. Preparació de les mostres	25
4.4.4. Electroforesis SDS-PAGE:	25
4.4.5. Electro-transferència a membrana PVCV	26
4.4.6. Bloqueig membrana	26
4.4.7. Immunodetecció	26
4.5. ANÀLISI BIOQUÍMICS PLASMÀTICS.	27
4.6. ANÀLISI ESTADÍSTIC.	27
<b>5. RESULTATS:.....</b>	<b>28</b>
5.1. AVALUACIÓ DE L'EVOLUCIÓ DEL PES I DE LA INGESTA.	28
5.2. AVALUACIÓ DEL ESTAT NUTRICIONAL.	28
5.3. METABOLISME DELS CARBOHIDRATS.	30
5.3.1. Corbes de tolerància a la glucosa:	30
5.3.2. Vies metabòliques.	32

<b>6. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSIONS .....</b>	<b>41</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>43</b>

## 1. RESUM

La supressió del gen *Spry1*(-/-) en ratolins produeix el desenvolupament de certs tipus de neoplàsies i certes alteracions en el seu metabolisme. L'objectiu de l'estudi és determinar l'efecte de la supressió del gen *Spry1* al metabolisme. Per aquest motiu es va realitzar una avaluació nutricional i metabòlica als ratolins *Spry1*(-/-) i Wild Type (WT) on se'ls hi subministra una dieta alta en greixos durant 3 mesos. La determinació dels paràmetres és realitza mitjançant l'avaluació del pes i la ingesta, valoració amb corbes de tolerància a la glucosa i la determinació de l'activació de les vies de senyalització a la insulina.

L'anàlisi de l'estudi ens mostra que els ratolins *Spry1*(-/-) tenen un consum de dieta major i un augment de pes menor respecte als WT; en els dos grups els paràmetres de desnutrició estan dins de la normalitat (albúmina, proteïnes totals, perfil lipídic); i en la ruta metabòlica de la senyalització a la insulina, els *Spry1*(-/-) no tenen una major expressió de les seves proteïnes (PI3K, AKT, AKT-p(Ser473)); indicant que no hi ha suficients evidències per suggerir que hi ha una alteració en la sensibilitat a la insulina així com al metabolisme energètic i que les diferències observades poden ser derivades de la pèrdua energètica a causa de la nefropatia.





## **RESUMEN:**

La supresión del gen *Spry1*(-/-) en ratones produce el desarrollo de ciertos tipos de neoplasias y ciertas alteraciones en su metabolismo. El objetivo del estudio es la determinación del efecto de la supresión del gen *Spry* en el metabolismo. Por este motivo, se realizó una evaluación nutricional y metabólica a los ratones *Spry1*(-/-) y Wild type (WT), donde se les da una dieta alta en grasas durante 3 meses. La determinación de los parámetros se realizó mediante la evaluación del peso, la ingesta, valoración con curvas de tolerancia a la glucosa y la determinación de la activación de las rutas de la señalización a la insulina.

El análisis del estudio nos muestra que los ratones *Spry1*(-/-) tienen un consumo de dieta mayor y un aumento de peso menor respecto a los WT; en los dos grupos los parámetros de desnutrición están dentro de la normalidad (albúmina, proteínas totales, perfil lipídico); y en la ruta metabólica de la señalización a la insulina, los *Spry1*(-/-) no tienen una mayor expresión de sus proteínas (PI3K, AKT, AKT-p(Ser473)); mostrando así que no hay suficientes evidencias para sugerir que hay una alteración en la sensibilidad a la insulina, así como en el metabolismo energético y que las diferencias observadas pueden ser derivadas de la pérdida energética por causas renales.



## **ABSTRACT**

The suppression of the mice gene *Spry1* (-/-) produces the development of cancer and metabolic alterations. The aim of the study is to determine the effect of suppressing gene *Spry1* in the metabolism. Consequently there was a nutritional and metabolic assessment where *Spry1* mice (-/-) and Wild Type (WT) are fed with a high fat diet for 3 months. The parameters determination is done by evaluating the weight and food intake, valoration with glucose tolerance curves and determining the activation of insulin signaling pathways.

The analysis of the study shows that mice *Spry1* (-/-) have a higher consumption of diet and an increase of weight compared to WT; in both groups the parameters are within normal malnutrition (albumin, total protein, lipid profile) and the metabolic pathway of insulin signaling, the *Spry1* (-/-) have no greater expression of their proteins (PI3K, Akt, p-Akt (Ser473)); indicating there is enough evidence to suggest that a change in insulin sensitivity as well as energy metabolism and the differences observed can be derived from the energy loss to kidney disease.



## 2. ANTECEDENTS

### 2.1. CÀNCER I METABOLISME

Avui en dia, és sap que els pacients oncològics presenten problemes nutritius, especialment anorèxia i pèrdua de pes on més del 50% dels adults amb càncer refereixen pèrdua de pes. Aquesta pèrdua està associada a una disminució en la supervivència i a un empitjorament en la qualitat de vida. La situació més greu s'anomena caquèxia, aquesta és considerada quan hi ha una pèrdua accelerada de massa muscular en el context d'una malaltia inflamatòria crònica. Apareix doncs, en moltes malalties cròniques com el càncer, VIH, cardiopaties avançades, fibrosis quística... entre d'altres.

En els pacients amb càncer la caquèxia no apareix únicament en estadis terminals de la malaltia, sinó que pot estar present en els primers estadis del creixement tumoral i inclús en algunes ocasions abans de que apareguin símptomes i signes neoplàsics. L'etiologia de la caquèxia neoplàsica és multifactorial, però és deu principalment en una disminució de la ingesta, un augment del gast energètic i a alteracions metabòliques medades per les citoquines inflamatòries (Del Fabbro E et al. 2011).

La caquèxia freqüentment està acompanyada per l'anorèxia, on la causa de la pèrdua de pes en el pacient oncològic és molt més complexa. La disminució de la ingesta d'aliments s'ha considerat com un dels principals factors causants de la malnutrició; tanmateix s'ha de considerar els altres factors, ja que l'increment de l'aport calòric no reverteix la caquèxia, ni millora el pronòstic dels pacients. Tanmateix hi ha estudis en humans que demostren que el simple fet de ser dona o home influeix en aquests factors i fins i tot alguns estudis demostren que les dones, pel fet de tenir estrògens tenen un efecte protector en determinats càncers i en alteracions metabòliques relacionades (Mullen, J. L. 1994).

Durant un període en dejú prolongat, el gast energètic i les necessitats calòriques disminueixen en gent sana; però s'ha observat que aquesta resposta és contrària en molts pacients amb càncer, on augmenten les seves necessitats calòriques, és a dir, es tornen hipermetabòlics, en gran part de neoplàsies com en leucèmies, limfomes, sarcomes, tumors al pàncrees i pulmó. En canvi en les neoplàsies gàstriques, colono-rectals i hepato-biliars són normo o hipometabòlics

Per tant, les principals alteracions metabòliques estarien relacionades amb els principis immediats, metabolisme d'hidrats de carboni, de proteïnes i del lípids.

En el metabolisme dels hidrats de carboni podem trobar alterades la resistència perifèrica a la insulina, un increment del metabolisme de la glucosa, disminució de la supressió de la producció endògena de glucosa i un increment de la gluconeogènesi entre d'altres. En diversos estudis es descriu com les cèl·lules tumorals presenten un increment en el consum de glucosa, produint elevades quantitats de lactat mitjançant glucòlisi anaeròbica. (Cavalieri, E. L et al. 2011). El lactat pot ser oxidat o regenerat a glucosa mitjançant gluconeogènesis al ronyó o al fetge mitjançant el Cicle de Cori. S'observa que en pacients amb caquèxia tumoral pot estar incrementat fins un 50%. S'ha calculat que l'energia perduda per l'increment del Cicle de Cori suposa unes 9 quilocalories per quilogram i dia, i un increment del 20-40% del gast energètic.

D'altra banda, els pacients tumorals presenten freqüentment una alteració en el metabolisme de la glucosa; això s'ha relacionat amb la resistència a la insulina a nivell hepàtic i muscular; i amb una disminució de l'alliberament d'insulina pancreàtica en resposta al increment de glucosa en sang.

## 2.2. AVALUACIÓ NUTRICIONAL

Les alteracions metabòliques degudes amb aquesta patologia és veuen reflexades en l'estat nutricional com hem vist anteriorment i és de gran importància tenir-hi un bon control per a no

Paràmetres en (mg/dL)	Ideal (sense diabetis)	ÒPTIM	Subòptim	Alt risc (acció requerida)
En dejú i abans dels àpats	65-100	70-145	>145	>160
Després de menjar	80-126	90-180	180-250	>250
Hora de dormir	80-100	120-180	<120 o 180-200	<80 o >200
Nocturnes	65-100	80-160	<75 o >160	<70 o 200

**Taula 1. Paràmetres dels nivells de glucosa plasmàtics.** Recomanacions de l'Associació Internacional de la Diabetes Mellitus (ISDM)

empitjorar el curs de la malaltia, que el tractament pugui fer el seu efecte i millorar així la qualitat de vida dels pacients. Per tant aquest control s'hauria de fer periòdicament primer de tot amb mesures antropomètriques (pes, circumferència mitja del braç...) i tot seguit amb proves bioquímiques que ens mostren amb més detall el bon funcionament l'organisme del pacient (Koom, W. S. et al. 2012).

Les proves bioquímiques per veure si un pacient està en un estat de desnutrició són l'albumina i la prealbumina; ja que indiquen una descompensació en el gast proteic. L'albumina ens serveix per veure si la desnutrició és més crònica ja que té una vida mitja de 20 dies mentre la

prealbúmina ens indica una desnutrició aguda. És considera hipoalbuminèmia quan els valors són inferiors a 3.5g/dL i es relacionen amb l'increment de morbiditat i mortalitat; valors de 2,8-3.5g/dL són suggestius de desnutrició lleu.

Un altre paràmetre utilitzat és la determinació d'urea, creatinina, àcid úric i fosfatasa alcalina, aquests paràmetres ens permeten veure si està funcionant correctament el metabolisme proteic així com la funció renal i hepàtica.

L'urea [CO-(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>], constitueix el principal compost d'excreció de l'amoniac que es forma pel catabolisme dels aminoàcids i de les proteïnes. És sintetitzada al fetge a partir dels aminoàcids i des de allí passa a la sang on finalment serà filtrada on es reabsorbeix un 40% als túbuls proximals i la resta es eliminada per via renal.

La concentració d'urea en el filtrat glomerular es igual a la del plasma, tot i que existeixen petites variacions en funció del sexe i l'edat; i altres com el grau d'ingesta proteica, la funció hepàtica i el nivell de catabolisme proteic endogen. L'augment de la concentració d'urea en sang, està estretament relacionada amb la seva eliminació i per tant, és un clar indicador d'insuficiència renal. Si la funcionalitat del ronyó es correcta però continua elevada l'origen de la urèmia pot ser degut a una alteració hepàtica, hemorràgia digestiva o un augment de formació d'urea.

La fosfatasa alcalina ens determina la quantitat d'enzim encarregat d'eliminar els grups fosfats, és a dir, de desfosforilar les proteïnes. Els seus valors es comprenen entre 44 a 147 UI/L i si estan augmentats significa que hi ha desnutrició, problema hepàtic i ossi; tot i que hi ha una afectació global de tot l'organisme per la seva funcionalitat.

## **2.3. METABOLISME ENERGÈTIC**

El metabolisme és un conjunt de reaccions químiques i processos fisiològics de l'organisme per a mantenir-lo en funcionament. Aquestes reaccions químiques s'organitzen en vies metabòliques, on cada substància es transformada en un altra per una seqüència d'enzims. Per al funcionament del metabolisme necessitem substàncies energètiques i aquestes les obtenim mitjançant la dieta o les reserves del propi organisme. Les substàncies necessàries que incorporem amb la dieta són aminoàcids, carbohidrats i lípids, que són essencials com a font d'energia, construcció de cèl·lules i teixits, entre d'altres (Dang, C. V., et al. 2009)

### **2.3.1. El metabolisme lipídic.**

Les alteracions en el metabolisme lipídic també són afectades abans del desenvolupament de l'anorèxia i la disminució de la ingesta. En el pacient amb càncer, la pèrdua de pes és produeix per la pèrdua de massa grassa, ja que la lipòlisi es troba accelerada, observant un augment dels nivell

d'àcids grassos lliures i glicerol; a causa de que el factor de necrosi tumoral inhibeix a l'enzim lipoproteïna lipasa i trobem els nivells de colesterol i triglicèrids plasmàtics elevats (Del Fabbro E et al. 2011).

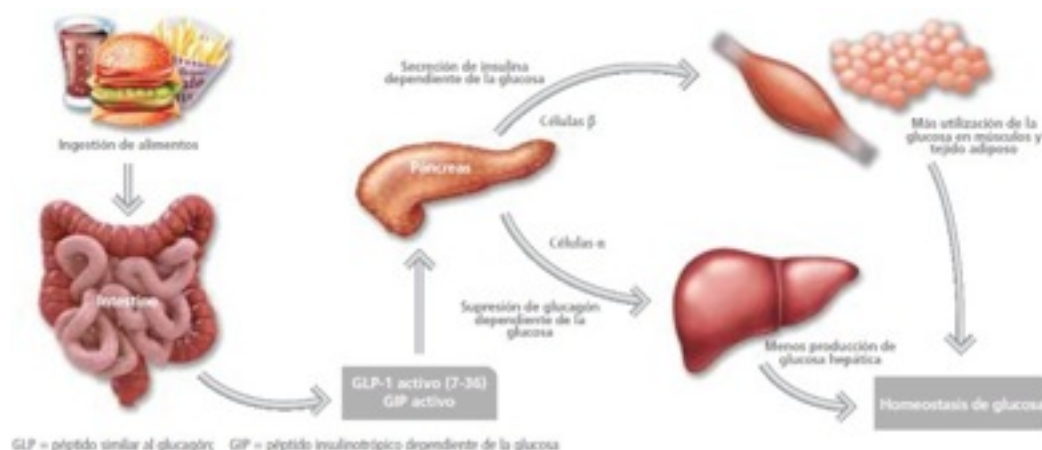
### 2.3.2. El metabolisme proteic.

Els malalts oncològics, la síntesi proteica és veu superada pel catabolisme proteic, el qual produeix una depleció de les proteïnes viscerals i musculars. Així mateix, els dipòsits de glucogen, les proteïnes musculars i la conversió dels aminoàcids a glucosa, passen a ser la primera font d'energia. (Seyfried, T. N., et al. 2014)

### 2.3.3. El metabolisme glucídic

La glucosa és el carbohidrat més important a l'organisme, amb el que s'obté una energia de producció més rendible dins les nostres cèl·lules i tant el cervell com el sistema nerviós només utilitzen glucosa com a font energètica. La glucosa s'incorpora als hepatòcits mitjançant el transportador passiu GLUT-2, i un cop al seu interior, la glucosa es transforma a glucosa-6-fosfat i d'aquí se'n va a dues vies metabòliques la glucòlisi o a la ruta de les pentoses fosfat, o bé a convertir-se en glucogen.

El múscul esquelètic té un paper molt important en la regulació del metabolisme glucídic, aquest és el principal responsable de la incorporació de glucosa depenen d'insulina, captant així fins al 80% de la glucosa de tot l'organisme. La glucosa sanguínia entra dins dels miòcits per un procés de difusió facilitada a través del transportador GLUT-4. Un cop dins de la cèl·lula, la glucosa es fosforilada i utilitzada per obtenir ATP i/o emmagatzemar-la en forma de glucogen als



**Figura 1. Metabolisme de la glucosa.** Amb l'ingesta d'aliments quant arriben al sistema digestiu, és detecta la presència de glucosa i és comencen activar uns sèrie de mecanismes. S'activa GIP (peptíde insulínotròpic depenen de glucosa) que senyalitza al pàncrees per a l'inici de la secreció d'insulina i per la supressió del glucagó. La glucosa es transportada als òrgans diana per a la seva metabolització.



músculs i al fetge. El mecanisme d'acció per la metabolització de la glucosa el podem observar gràficament a la figura 1.

El requeriments energètic immediats i a curt termini, l'organisme l'agafa de la glucosa plasmàtica circulant i un cop han disminuït els nivells de glucosa en sang, els miòcits obtenen l'energia de les reserves de glucogen. En els dos processos comença un procés de degradació de la glucosa o glucogen on és transforma en piruvat. Aquest piruvat mitjançant l'enzim piruvat deshidrogenasa el metabolitza i es forma  $\text{CO}_2$  i Acetil CoA i dona lloc al començament del Cicle de Krebs per a l'obtenció d'energia per via aeròbica. Per via anaeròbica el piruvat es redueix a lactat i aquest mitjançant l'enzim lactat deshidrogenasa i es produeix el Cicle de Cori (Noch, E., et al 2012)

Tot el metabolisme glucídic és molt complex i el seu funcionament condiona al funcionament de pràcticament tot l'organisme. Per això una de les determinacions bàsiques per saber si està alterat és mesurar la glucosa sanguínia en condicions basals.

Hi ha situacions on la capacitat de captació de glucosa es troba alterada a causa dels òrgans perifèrics i conseqüentment hi ha un augment de la glucosa sanguínia que pot produir greus problemes a tot l'organisme.

Els nivells de glucosa basal, són aquells que es determinen quant l'individu està en dejú, és a dir, duu un mínim de 8 hores sense ingerir cap tipus d'aliment ni beguda calòrica. Aquests nivells basals són els que s'utilitzen més per realitzar el diagnòstic d'alteracions en el metabolisme glucídic, que seria quant els nivells de glucosa basal són  $>120\text{mg/dL}$ ; tot i que variant la situació de la vida quotidiana van variant els valors òptims de la quantitat de glucosa al organisme, com podem observar en la Taula 1.

### **2.3.3.1. Insulina**

La insulina és una de les hormones anabòliques principals en la regulació del metabolisme energètic, ja que té efecte directe sobre el metabolisme glucídic com el lipídic. La seva funció principal és que els hepatòcits, miòcits i adipòcits captin la glucosa que és troba circulant per la sang i aquesta sigui emmagatzemada en forma de glucogen. La insulina és un polipèptid format per 51 aminoàcids distribuïts en dues cadenes peptídiques unides per ponts disulfur. Aquesta es sintetitzada als Illots de Langerhans per les cèl·lules beta del pàncrees en la seva forma inactiva. (Zhang, Z., et al. 2013)

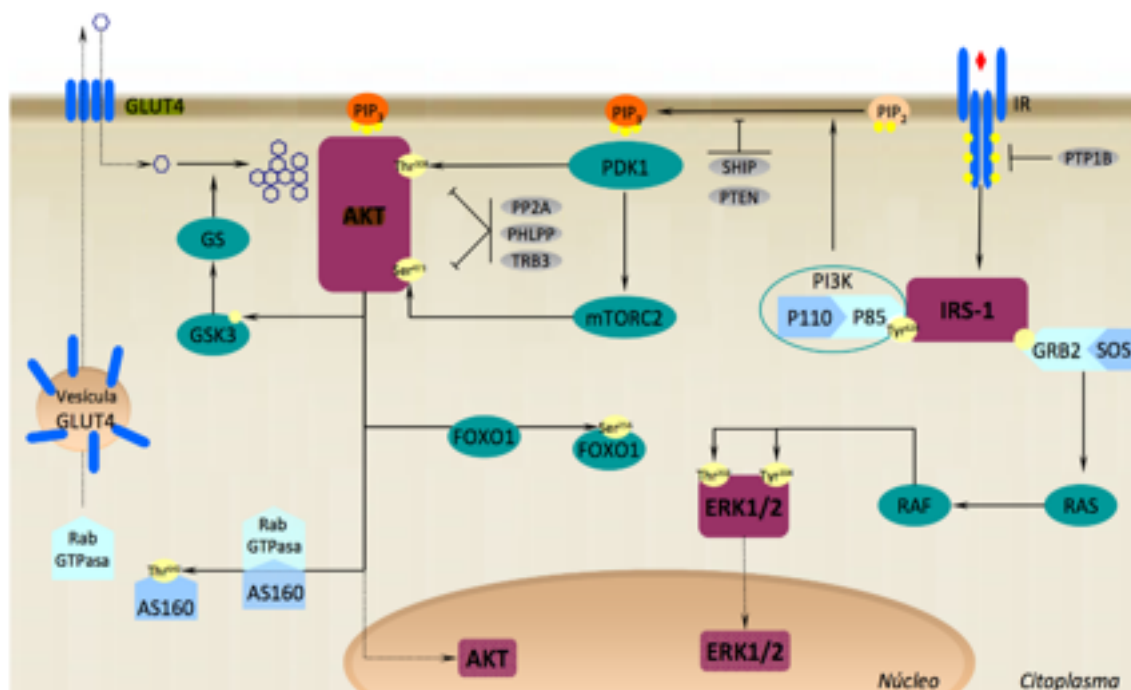
En primer lloc és forma la preproinsulina i dins del reticle endoplasmàtic es forma la proinsulina; aquesta perd el seu extrem amino-terminal on al Aparell de Golgi és separa del pèptid i es genera la insulina funcional. Aquesta quant els nivells de glucosa augmenten, comença

alliberar-se i als teixits diana s'inicia la captació de glucosa que penetren gràcies al transportador de glucosa GLUT-2 i aquest l'utilitzen com a font d'energia o l'emmagatzemen.

### 2.3.3.2. Resistència a la insulina

La resistència a la insulina es defineix com la pèrdua de la sensibilitat a la insulina als teixits perifèrics, especialment al múscul esquelètic i al teixit adipós. Aquesta és una alteració genètica o en la majoria dels casos és adquirida per diversos factors de riscs com el sobrepès, obesitat, baixa activitat física... per això la resistència a la insulina, està associada directament amb la Diabetis Mellitus tipus 2 i alguns tipus de càncer. Per tant, en aquesta patologia trobem alterats en augment els nivells de glucosa i de insulina, i un augment de d'àcids grassos lliures (Roberts, C. K; 2013)

Una bona determinació d'aquesta alteració es realitza mitjançant una corba de tolerància a la glucosa o a la insulina, el qual és un mètode diagnòstic útil per veure primerament els nivells basals de glucosa, i tot seguit, després de subministrar glucosa per via subcutània, per veure si la insulina fa el seu efecte i fa disminuir els nivells de glucosa després del primer pic de glicèmia plasmàtica després dels 120 minuts de l'administració.



**Figura 2. Ruta Senyalització a la Insulina.** Proteïnes implicades en la metabolització de la insulina. (Adaptada de Gonzalo. H , 2012)

En la Figura 2 és pot observar esquemàticament les proteïnes implicades en la senyalització de la insulina, les quals són explicades a continuació.

El GLUT-4, és la proteïna responsable de la incorporació de la glucosa al interior de les cèl·lules musculars i dels adipòcits. GLUT-4 es troba al citoplasma i després de rebre l'estímul de la insulina es transloca a la membrana plasmàtica afavorint el moviment de la glucosa del torrent sanguini als teixits. GLUT-4, si no hi ha insulina és troba dins de la cèl·lula en vesícules que són portades cap a la membrana plasmàtica quant és activat el complex proteic PI3K i PKB/AKT (Benjamin, D. I et al.2012).

En aquest procés pot haver-hi una alteració en el transport de glucosa i de la translocació de la proteïna GLUT-4 per deficiències en l'activitat del receptor de la insulina, com ara el IRS-1, IRS-2 i la quinasa de fosfoinositol trifosfat (PI3K).

La ruta de les PI3K es activada pels receptors amb activitat catalítica tirosin quinasa d'insulina, factors de creixement, i altres receptors implicats en la proliferació cel·lular. La PI3K, és un enzim amb dues subunitats p85 i p110, on p85 pot unir-se directament a la cadena beta del receptor d'insulina. És sap que la PI3K és una de les proteïnes que participa en la regulació del triglicèrids, en processos de diferenciació, síntesi i degradació de carbohidrats, lípids i proteïnes, en la senyalització de membrana i el transport de glucosa mediada per la insulina.

PI3K, juntament amb les seves subunitats són les encarregades s'unir proteïnes amb dominis PH, importants perquè és el lloc on es produeix la fosforilació. PI3K fosforilen PIP2 i aquesta passa a un segon missatger PIP3 que recluta a la membrana a PDK1, PDK2 i AKT, que posteriorment aquestes són les encarregades de fosforilar PDK1 en els aminoàcids Treonina 308 (Tre308) i PDK2 i mTORC2 a la Serina 472 (Ser473) de AKT i llavors AKT es troba amb una activació completa.

Les proteïnes AKT juguen un paper molt important en la senyalització cel·lular, en processos de gluconeogènesi i lipogènesi; en hi ha 3 subfamílies AKT1, AKT2 i AKT3. La AKT1, està involucrada en la supervivència cel·lular, és clau en la hipertròfia del múscul esquelètic i també està implicada en molts tipus de càncer. La AKT2, està involucrada en la via de senyalització a la insulina on indueix el seu transport per mitjà la fosforilació; aquesta és troba expressada en diferents teixits sensibles a la insulina com el teixit adipós, el fetge i el múscul esquelètic. Es tal l'implicació d'aquesta proteïna en relació amb la insulina, que diversos estudis han demostrat que la supressió de AKT2 causa resistència a la insulina i consegüentment diabetis mellitus tipus II (George et al.2004).

AKT, un cop activada por anar per dues vies, per a l'activació de GLUT-4 que farà que hi hagi una captació de glucosa i entri als teixits i es realitzi un procés de glucòlisi, com hem vist anteriorment; o bé que AKT fosforili GSK3 i aquest utilitzi la glucosa que entre per GLUT-4 per a la formació de glucogen als teixits musculars.

En aquesta petita introducció relacionada amb el càncer i les seves possibles alteracions relacionades amb el metabolisme dels carbohidrats, entre d'altres. En nostre estudi utilitza uns ratolins com a model d'animal d'experimentació on la supressió del Spr1(-/-) mostra clarament un efecte neoplàsic en els ratolins i una alteració metabòlica la qual encara no està descrita i aquest serà un dels nostres objectius d'investigació. A continuació és presenta una petita introducció del model experimental utilitzat en l'experiment.

## **2.4. MODEL EXPERIMENTAL PER L'ESTUDI:**

### **2.4.1. Sprouty**

Sprouty (Spry) és una família de quatre proteïnes (SRPY1-SPRY4), que actuen principalment en la senyalització de Receptors Tirosina Quinasa, inhibint la senyal d'aquest receptors.

Els receptors Tirocin Quinasa són enzims capaços de transferir un grup fosfat a un residu de tirosina d'una proteïna, és a dir, fosforilen i produeixen la transducció de senyals que regulen les activitats enzimàtiques. Aquestes proteïnes tenen seqüències de gens identificats ortòlegs en ratolí, humà, peix zebra, granota i pollastre (Manson et al.; 2006), per tant el seu estudi ens pot ajudar a treballar amb determinades patologies que envolten aquesta proteïna.

La família dels Sprouty actua majoritàriament com a reguladors negatius en diferents vies de senyalització, el que fa pensar que els gens Spry tenen una gran relació en el desenvolupament de certs càncers. Ja que l'expressió del Spry1 i Spry2 s'ha trobat disminuïda en diferents neoplàsies com ara el càncer de mama on s'ha vist que el 96% tenen suprimida l'expressió de Spry1, càncer de pròstata, carcinoma hepatocel·lular, limfoma de cèl·lules B, neuroblastoma... (Schutzman JL, et al. 2014; Fong et al, 2006 ; Frank et al, 2009).

#### **2.4.1.1. Sprouty 1**

La proteïna SPRY1 és compon de 319 aminoàcids, té un domini ric en cisteïna C-terminal. SPRY1 conté 23 residus de cisteïna, 19 dels quals són compartits entre els quatre membres de la família. Aquest domini ric en cisteïna facilita la formació de homo- i heterodímer entre les proteïnes SPRY (Ozaki et al., 2005). Les funcions de SPRY1 com un regulador de les vies fonamentals de senyalització i la seva activitat està regulada per modificacions post-traduccionals; aquest és fosforila en resposta als factors de creixement, factor de creixement de fibroblasts i el factor de creixement derivat de plaquetes (Mason et al., 2004).

El model animal que nosaltres utilitzarem són els Spry1(-/-); s'ha observat que els ratolins Knockout per Spry1(-/-) desenvolupen greus problemes renals i en el seu tracte genito-urinari, semblants a un síndrome que és troba en els humans conegut com Cakut, que té anomalies

congènites als ronyons i les vies urinàries (Basson et al., 2006). Aquest fenotip comença aparèixer en el moment embrionari durant el desenvolupament de la gemma uretèrica, una estructura epitelial que es ramifica des del conducte de Wolff per iniciar la formació del ronyó. Per tant, els ratolins knockout de *Spry1*(-/-) desenvolupen una gemma uretèrica molt ampla i hi ha un gran nombre brots de gemmes ectòpiques des de diverses posicions del conducte de Wolff i produint la mort prematura dels ratolins *Spry1*(-/-) als 5 mesos d'edat degut a tots aquest problemes renals que apareixen en el primer procés de formació del sistema renal (Basson et al., 2005).

Estudis recents, de membres del nostre Institut de Recerca han proposat a *Spry1*(-/-) com a gen supressor en altres varietats de patologies canceroses com és el carcinoma de tiroides (Macià et al, 2012), però a l'hora d'estudiar-ho s'han trobat amb alguns problemes possiblement metabòlics que afecten en aquests ratolins.

Com hem vist anteriorment, aquest ratolins moren amb 5 mesos de vida, el que impedeix veure realment el procediment complert de les neoplàsies causades per la supressió, fet que comporta que en aquest 5 mesos no és desenvolupi completament el carcinoma de tiroides, i només és troba que els adults joves tinguin una hiperplàsia de les cèl·lules C de la tiroides. Al contrari de la nefropatia, l'afectació de la supressió a les glàndules tiroides és un procés que comença després del naixement i per això el seu desenvolupament és més lent.

Les raons del perquè ens proposen fer l'estudi és que aquest ratolins *Spry1* (-/-) no tenen un pes tant elevat i no tenen pràcticament teixit adipós respecte al grup de la soca nativa, per tant és necessari determinar el paper dels *Spry1*(-/-) en la regulació del metabolisme.

### 3. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

#### Justificació:

Donats aquests antecedents sobre el càncer i les seves alteracions metabòliques; a l'Institut de Recerca Biomèdica, es treballa amb uns ratolins KO per Spry1(-/-) els quals són precursors per certs tipus de càncer. Durant les seves investigacions amb aquest model animal, s'ha esdevingut que els ratolins tenen un menor augment de pes i una menor quantitat de teixit adipós, reserves energètiques, que els ratolins WT; aquestes dades encara no estan publicades.

Sabem que certs tipus de càncer modifiquen clarament el metabolisme de l'organisme, sobretot el metabolisme energètic on hi ha alteracions en la resistència perifèrica a la inulina, un increment del metabolisme de la glucosa, disminució de la supressió de la producció endògena de glucosa, catabolisme proteic, augment de la lipòlisi entre d'altres.

Estudis recents amb aquests ratolins KO demostren que aquest carcinoma apareix en edats adultes i donat que aquests ratolins moren als 5 mesos degut a la nefropatia no hi ha pràcticament afectació metabòlica per part de les tiroides, només hi ha una hiperplàsia de les seves cèl·lules C i no hi ha afectació en les hormones TSH, T3 ni T4. Per tant la realització d'aquest estudi es basa en l'estudi metabòlic i nutricional dels ratolins KO i WT per determinar quines són causes o variacions metabòliques, ja que els KO tenen un augment de pes menor respecte als WT.

La realització d'aquests estudi és basa en l'estudi metabòlic i nutricional de ratolins KO per Spry1 (-/-) i WT per determinar la possible funció Spry1 (-/-) en el metabolisme energètic, esbrinar quines són les causes del perquè els ratolins KO no augmenten el tant de pes respecte al grup control. S'utilitza una dieta alta en greixos per accelerar el temps d'estudi, donada la mort prematura dels Spry1 (-/-) per la nefropatia.

#### Objectius:

L'objectiu principal del treball es l'estudi metabòlic i nutricional dels ratolins KO per Spry1 (-/-) i WT amb l'ingesta d'una dieta amb alt contingut lipídic.

Els objectius secundaris:

- Avaluar l'estat nutricional dels ratolins Spry1 (-/-) i WT, utilitzant les mesures de pes i ingesta dietètica, en una dieta alta en greixos.
- Avaluar el metabolisme dels carbohidrats dels ratolins Spry1 (-/-) i WT mitjançant la corba de tolerància a la glucosa i veure el seu efecte en les vies de senyalització de la insulina a través de la determinació de l'activació de l'AKT.

## 4. MATERIALS I MÈTODES:

### 4.1. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ:

El model d'animals utilitzats són per una banda, el ratolins WT, utilitzats com a controls (n=14) i com a grup experimental ratolins KO per *Spry1*(-/-) (n=10); aquests model animal és utilitzat per a gran diversitat d'estudis però com a factor principal el càncer. En el nostre cas però, estudiem el metabolisme i l'estat nutricional dels dos grups.

Els ratolins Knockout per *Spry1*(-/-) utilitzats en aquest treball han estat cedits pel Dr. Mario Encinas, del grup de Senyalització Oncogènica i del Desenvolupament del nostre Institut de Recerca Biomèdica IRBLLeida-Universitat de Lleida.

L'experiment s'ha iniciat quant els ratolins tenien 6 setmanes de vida i se'ls administra una dieta alta en greixos Taula 2. (Harlan C TD.88137) amb 4.5Kcal per gram i aigua *ad-libitum* durant 12 setmanes on setmanalment és va controlar l'ingesta i el pes dels ratolins. La dieta alta en greixos és subministrada per accelerar els efectes i causar el màxim impacte, ja que els ratolins es moren en 5 mesos de vida i

Transcorregut el període de 3 mesos és procedeix amb el sacrifici dels ratolins per a l'obtenció de les mostres per analitzar l'efecte del l'ingesta alta en greixos en els *Spry1*(-/-).

	% del pes	% Kcal
<b>Proteïnes</b>	17.3	15.2
<b>Carbohidrats</b>	48.5	42.7
<b>Lípids</b>	21.2	42.0

Taula 2. Composició macronutrients dieta alta en greixos. Harlan C TD.88137.

Els mètodes experimentals utilitzats amb aquests animals s'han regit i aplicat segons la normativa vigent sobre animals d'experimentació:

- Llei 5/1995, de 21 de juny, de la Generalitat de Catalunya, de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per a altres finalitats científiques.
- Decret 214/1997, de 30 de juliol, que desenvolupa l'esmentada llei.
- Reial Decret 1201/2005, de 10 d'octubre, sobre protecció dels animals utilitzats per a experimentació i altres finalitats científiques.

Tots els procediments on es van utilitzar ratolins d'experimentació, es van realitzar sota la supervisió del personal pertinent de la Universitat de Lleida-IRBLLeida, respectant totes les

disposicions ètiques i legals vigents per a la manipulació d'animals d'experimentació i el treball ha estat aprovat per Comité Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Lleida.

#### **4.2. INGESTA I EVOLUCIÓ DEL PES:**

Als ratolins se'ls hi ha fet un seguiment setmanal de la seva ingesta i del seu pes. Cada setmana s'han pres les mesures en les condicions més semblants possibles; sobre la mateixa hora, en la mateixa balança electrònica (0.01g) i en el mateix dia de la setmana per evitar possibles variacions o alteracions dels ratolins.

#### **4.3. CORBES DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA**

Els ratolins es deixen mínim de 8 hores amb dejú, se'ls hi treu la dieta però es continua deixant l'aigua *ad-libitum*. Se'ls hi subministra la quantitat de glucosa indicada anteriorment i és mesura amb un glucòmetre i les tires reactives on es necessari una petita gota de sang que se li extreu de la cua.

Per determinar si hi ha alteració en el metabolisme dels hidrats de carboni, un dels millors indicadors és la glucosa basal i la realització d'una corba de tolerància a la glucosa, que ens permetrà veure el funcionament de la senyalització a la insulina. Aquest test de tolerància a la glucosa es realitza primerament amb la determinació de la glucosa basal i després s'administra glucosa per via subcutània una concentració de 2g de glucosa per quilogram de ratolí i es torna a mesurar en diferents temps 20, 40, 60 i 120 minuts. Prèviament a l'inici de la corba, s'ha de pesar cada ratolí per saber la concentració exacta ha administrar.

#### **4.4. IMMUNODETECCIÓ PER WESTERN BLOT:**

L'immunodetecció de proteïnes es realitzar per Western Blot en teixit muscular dels animals de l'estudi. La proteïna és va extreure del múscul quàdriceps femoral de la pota esquerra i congelació immediata amb nitrogen líquid; per a determinar les proteïnes relacionades amb el metabolisme energètic i amb la via de senyalització de la insulina.

##### **4.4.1. Obtenció de les proteïnes**

Els teixits s'homogenitzen amb aproximadament 100 mg de teixit per cada 500uL de tampó d'homogenització, s'utilitza un Ultra-Turrax (3420000 IKA) per triturar-ho. El tampó d'homogenització conté 5mM de 3-(N-morpholino- propanesulfonic àcid, 2 mM de EDTA, 1 mM dethyl-triamine-penta acètic àcid, antioxidant BHT 1 µM, inhibidors de fosfatases fluorur de sodi 1 mM i ortovanadato de sodi 1 mM i 1,5% de inhibidor de proteases 100x (Thermo Scientific, 78430)



que eviten que les proteïnes es degradin i poder mantenir les condicions musculars el menys alterades possible.

#### 4.4.2. Quantificació de les proteïnes

Els teixit muscular s'homogenitza i es quantifiquen les proteïnes mitjançant el mètode Bradford (Protein Assay, #500-0006 Bio-Rad). Aquest mètode és basa en l'unió dels residus bàsics i aromàtics dels aminoàcids, donant lloc a una reacció colorimètrica blava que es mesura al espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm. Aquesta mesura s'interpolen amb els resultats obtinguts de la recta patró de BSA (albúmina bovina sèrica) realitzada a concentracions conegudes; i obtenim la concentració de proteïna en ug/uL.

#### 4.4.3. Preparació de les mostres

Un cop quantificada la mostra, és prepara en relació a la quantitat de proteïna específica per a la determinació de la proteïna a estudiar.

Generalment per carril al gel de poliacrilamida, es fica un total de 20ug a 40 ug de proteïna, juntament amb una solució amb agents reductors, SDS i beta-Mercaptoetanol, Blau de Bromophenol per donar coloració i Glicerol per donar densitat a la mostra.

Abans de carregar-les al gel, es fiquen a un termobloc a 95°C durant 3 minuts per a desnaturalitzar les proteïnes i així es puguin separa segons el seu pes molecular.

Les mostres en aquest cas no és preparen de manera individual, per tal de ser més pràctics i tenir resultats més objectius a raó del nostre número de mostres s'han preparat *pools*. És dir, s'han preparat les mostres en relació als dos grups experimental WT i Spry1(-/-); i també s'han fet una separació per sexes, tenint en total de 6 grups: WT , Spry1(-/-), WT Femelles, WT Mascles, Spry1 Femelles i Spry1 Mascles. S'han introduït dins de cada grup tots els integrants que compleixin les mateixes característiques a raó del sexe i del grup d'estudi al qual estan.

#### 4.4.4. Electroforesis SDS-PAGE:

El gel utilitzat per l'electroforesis és al 10% de Bis-Acrladamida i està compost de dues parts: la part de d'alt és el gel empilador, el qual permet que les proteïnes comencin a migrar totes des del mateix punt i el gel de sota, és el gel separador que ens permet separar les proteïnes segons el seu pes molecular.

Aquesta separació es dur a terme dins d'unes cubetes d'electroforesi juntament amb un tampó de migració que conté 25mM Tris, 1,44% glicina i 0,1% SDS; en el qual mitjançant un camp

elèctric (15 mA per gel) que permet la separació de les proteïnes per a la seva determinació. Per tenir una guia de pes de les proteïnes, al gel hi carreguem un marcador de pes molecular.

#### 4.4.5. Electro-transferència a membrana PVCV

Un cop les proteïnes estan separades és realitza l'electro-transferència de les proteïnes del gel a una membrana de PVDF (IPVH00010 Immobilon-P de Millipore). El tampó de transferència està compost de 25mM de Tris, 192mM de glicina i 10% de SDS a pH 8.2 i es transfereix a un voltatge constant de 100V, el temps dependrà de la mesura de la proteïna a transferir.

#### 4.4.6. Bloqueig membrana

Quant les proteïnes estan transferides a la membrana és realitza un bloqueig d'una hora o durant tota la nit a 4°C amb agitació. Depenen del anticòs, si es troba fosforil·lat o no, es realitza amb I-Block o amb TBST (20 mM Tris a pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) amb 5% d'albúmina de sèrum boví. Aquest bloqueig ens serveix per tal d'eliminar les hibridacions inespecífiques.

#### 4.4.7. Immunodetecció

Després de fer 5 rentats de 5 minuts amb TBST per eliminar restes de la solució de bloqueig, incubarem les membranes amb els anticossos primaris indicats a la Taula 2. una hora a temperatura ambient o bé tota la nit a 4°C. Transcorregut aquest temps fem 3 rentats de 5 minuts amb TBST i li apliquem l'anticòs secundari que el deixem actuar durant 1 hora a temperatura ambient.

Anticòs primari	Pes	Casa	Referència	Dilució
AKT	62 KDa	Invitrogen	44-0609G	1/1000
AKT-p (Ser 473)	62 KDa	Cell Signaling	9271	1/1000
AKT-p (Thr703)	62 KDa	Cell Signaling	4056	1/1000
PTEN	54 KDa	Cell Signaling	9599	1/1000
GLUT-4	50 KDa	Abcam	ab654	1/2500
PI3K	85KDa	Cell Signalling	4247	1/1000

Anticòs secundari	Casa Comercial	Referència	Dilució
Rabbit	Pierce	31460	1/40000
Mouse	GE-Healtcare	NA931	1/40000

**Taula 2. Anticossos utilitzats en treball d'investigació.**

Tot seguit realitzem 5 rentats amb TBST 0.1% de Tween per tal d'eliminar les restes d'anticòs secundari. Aquest Anticòs secundari està conjugat a una peroxidasa (HRP) i per detectar la senyal apliquem uns reactius comercials que s'associen a la catàlisi del peròxid d' hidrogen a l'oxidació del luminol (Luminol TM, Western Chemiluminiscent HRP de Millipore Corporation, Billerica MA, EE.UU.); donant lloc a un augment de la quimioluminiscència. Per veure aquesta senyal s'ha d'exposar al ChemiDoc XRS (Bio-Rad) i s'analitza mitjançant el programa (Imatge Lab).

La quantitat de luminiscència obtinguda en l'exposició serà proporcional a la quantitat de proteïna a estudiar.

#### **4.5. ANÀLISI BIOQUÍMICS PLASMÀTICS.**

Per a la realització dels anàlisi bioquímics s'utilitza plasma de cada ratolí extret en el moment del sacrifici a punt final.

La sang s'extreu mitjançant un tub amb anticoagulant heparina, on la sang puja mitjançant capil·laritat. Aquesta sang es centrifuga a 2000rpm durant 10 minuts i s'extreu el plasma on es congela immediatament a -20°C o es procedeix a realitzar immediatament les determinacions dels paràmetres bioquímics.

Els paràmetres analitzats varen ser HbA1c ( 43091), Fructosamina (1001158), Colesterol Total (1001091), LDL (41023), HDL (1001098), Triglicèrids (1001310), Àcid Úric (1001010), Lactat (1001331), Albúmina (101023), Fosfatasa Alcalina (1001130), Urea (1001333), tots realitzats amb kits enzimàtics (Spinreact); tots aquests kits ens permeten realitzar mesures quantitatives de cada un dels paràmetres.

#### **4.6. ANÀLISI ESTADÍSTIC.**

Els anàlisi estadístics s'han realitzat mitjançant el programa informàtic GraphPadPrims (v6). A nivell d'estadística descriptiva s'ha utilitzat la mitjana com a mesura de tendència central i la desviació típica com a estadístic de dispersió.

Previ a l'inici de l'anàlisi inferencial, s'ha comprovat que les variables s'ajusten a la distribució normal. Per fer-ho s'utilitzat la prova de Shapiro-Wilk, perquè la mida mostral és inferior a 50 subjectes. Cap de les variables s'ajusta a la distribució normal i és s'opta per realitzar un anàlisi no paramètric. Per analitzar les diferències entre grups és va realitzar el test Kruskal-Wallis amb una significació del 0,05.

## 5. RESULTATS:

### 5.1. AVALUACIÓ DE L'EVOLUCIÓ DEL PES I DE LA INGESTA.

Els dos grups d'estudi han estat un total de 12 setmanes amb administració d'una dieta alta en greixos on s'han realitzat controls setmanals de pes i ingesta, amb administració d'aigua *ad-libitum*. Com s'observa a la Taula 3 els valors de pes són diferents respecte als dos grups tant en el pes inicial, com en el pes final; però si fem la relació entre el que han consumit dietèticament i el pes que han augmentat, veiem clarament que els ratolins WT han guanyat 0.9 grams a la setmana i els Spry1(-/-) han augmentat 0,7 grams; per tant han guanyat més pes el grup control. El grup WT ha guanyat més pes que els Spry1(-/-), però aquest grup ha consumit menys quantitat dietètica i conseqüentment menys quilocalories que el grup experimental.

	Wild tipe	Sprouty1 -/-
Pes inicial (grams)	21.4 ± 7.4	27.2 ± 5.8
Pes final (grams)	28.6 ± 1.8	31.6 ± 2,1
Ingesta dietètica per setmana (grams)	2.96 ± 0.60	3.15 ± 1.07
Increment de pes per setmana (grams)	0.90 ± 0.59	0.70 ± 0.34

Taula 3. *Evolució del pes amb relació a l'ingesta.*

### 5.2. AVALUACIÓ DEL ESTAT NUTRICIONAL.

L'avaluació de l'estat nutricional dels ratolins s'ha dut a terme mitjançant unes proves bioquímiques en plasma a punt final del ratolí, és a dir, a 5 mesos de vida.

Les globulines són un gran indicador de l'estat nutricional dels individus, una d'elles és l'albumina.

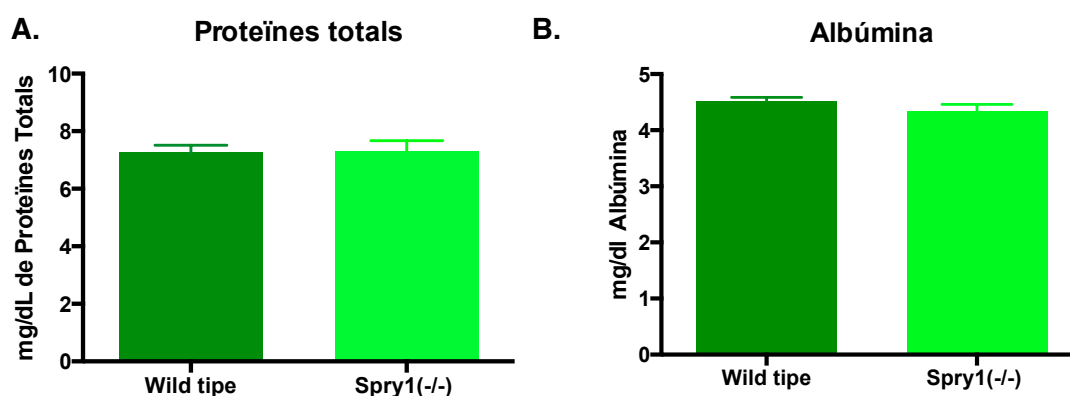


Figura 3. *Paràmetres relacionats amb la desnutrició A. Concentració de proteïnes totals en plasma. B. Concentració de d'Albúmina en plasma. Els resultats és mostren com a mitjana ± DE.*

Com s'observa en la Figura 3, de les proteïnes totals no hi ha diferències significatives tot i que està lleugerament disminuïda en el grup dels Spry1(-/-).

Així com en la Figura 3, on trobem l'albumina tampoc hi ha diferències, tot que també està lleugerament disminuïda en (Spry1(-/-)). Els resultats estadístics no significatius són de 4.5 g/dL en el WT i 4.3 g/dL en els Spry1 (-/-).

En aquest estudi se'ls hi ha subministrat una dieta alta en greixos i per això es important conèixer el perfil lipídic dels grups d'estudi i saber si hi ha alteracions en el metabolisme dels greixos. Com s'observa en la Taula 4 tenim els valors del perfil lipídic, no hi ha cap valor entre els grups que ens doni diferències significatives entre les lipoproteïnes.

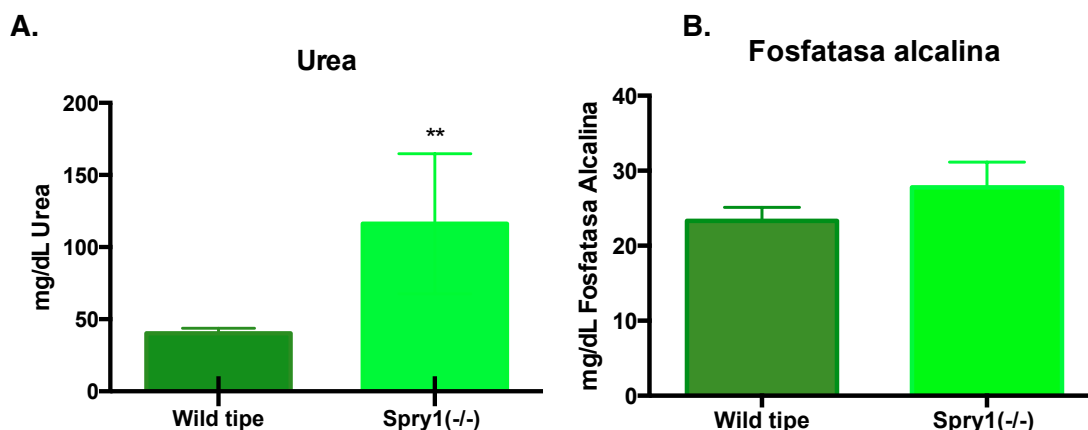
Els valors de colesterol total estan alterats, hi ha una hiperlipidèmia en els dos grups. El grup experimental té lleugerament augmentats el colesterol total 273 mg/dL, respecte als 269 mg/dL dels WT. Però si comprarem amb els HDL i LDL, trobem diferents significacions. Els HDL, el colesterol que ajuda a la metabolització dels greixos esta per sota del valor dels WT i el LDL augmentat. En el cas dels triglicèrids, els Spry1(-/-) tenen un valor molt més baix que els WT, tot i que no és significatiu.

	Wild tipe	Sprouty1 -/-
<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	<b>269 ± 19</b>	<b>273 ± 23</b>
<b>HDL (mg/dL)</b>	<b>105 ± 4</b>	<b>98 ± 7</b>
<b>LDL (mg/dL)</b>	<b>166 ± 10</b>	<b>174 ± 13</b>
<b>Triglicèrids (mg/dL)</b>	<b>120 ± 10</b>	<b>103 ± 11</b>

**Taula 4. Perfil lipídic plasmàtic.** Els resultats és mostren com la mitjana ± DE.

És va analitzar també altres paràmetres relacionats amb la desnutrició com la urea i la fosfatasa alcalina, aquests dos paràmetres són molt importants ja que sabem que els ratolins knockout tenen una nefropatia important i és rellevant la seva determinació.

Com podem observar el la Figura 4 on trobem la concentració d'urea en plasma, hi ha diferències estadísticament significatives ( $p < 0.05$ ), entre els dos grups d'estudi sent superior en el grup dels Spry1(-/-); no obstant s'hauria de corroborar si aquest increment es degut al catabolisme proteic o hi ha menys excreció, això es corroboraria amb la determinació de la urea urinària, però no és va poder obtenir orina per a la seva determinació.



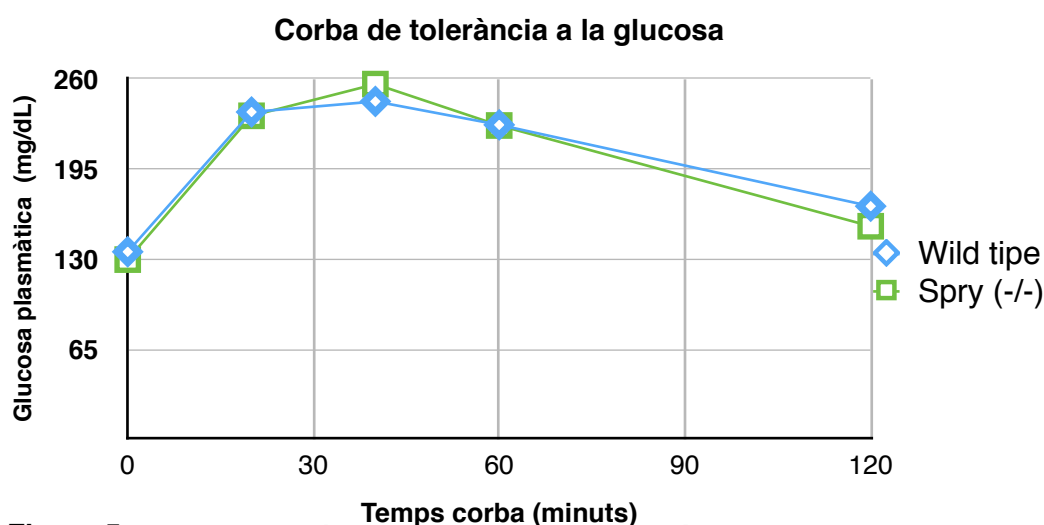
**Figura 4. Paràmetres relacionats amb la desnutrició i el dany renal A.** Concentració de d'urea en plasma. (\*\*Estadísticament significatiu  $p < 0.05$  dels Spry femella respecte a la resta de grups. **B.** Concentració de Fوسفاتasa Alcalina en plasma. Els resultats és mostren com a mitjana  $\pm$  DE.

Si s'observa la Figura 4 de la quantitat de fوسفاتasa alcalina, trobem una concentració major als Spry1(-/-) 27.8 mg/dL, respecte als 23.3 mg/dL del grup dels WT; tot i que aquests dos valors estan dins de la normalitat i no tenen significança.

### 5.3. METABOLISME DELS CARBOHIDRATS.

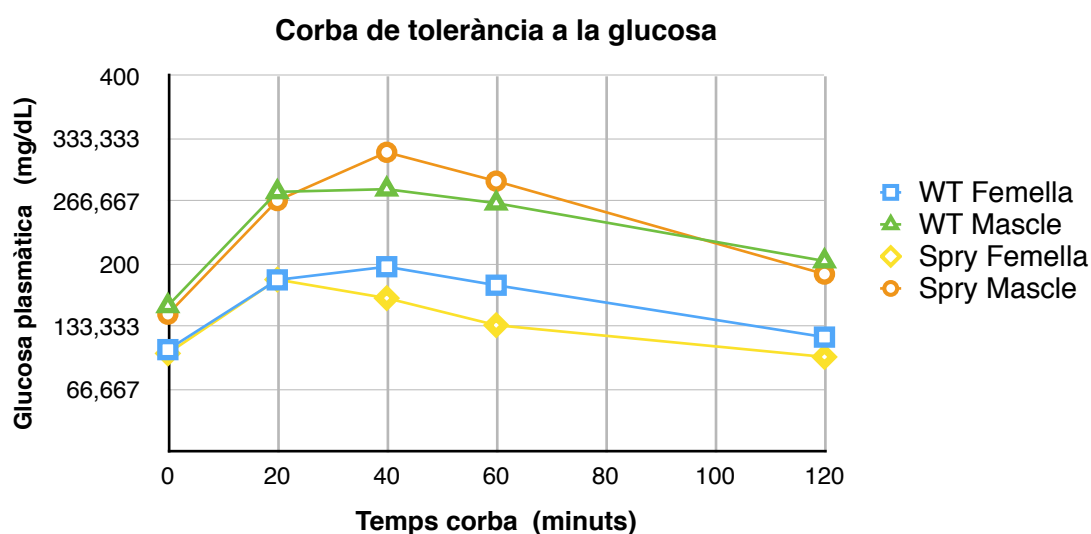
#### 5.3.1. Corbes de tolerància a la glucosa:

Per conèixer el metabolisme dels hidrats de carboni és essencial la determinació de glucosa per poder apreciar i valorar les alteracions en la concentració plasmàtica de la glucosa. Per això es realitza una corba de tolerància a la glucosa on es fa una mesura a temps 0, 20, 40, 60 i 120 minuts; el resultats de la corba els podem observar en la gràfica de dispersió de la Figura 5.



**Figura 5. Corba de tolerància a la glucosa. Separació per grups.** Determinació en sang total, en els temps 0, 20, 40, 60 i 120 minuts. Els resultats és mostren com a mitjana  $\pm$  DE.

Els resultats de la Figura 5, no mostren diferències entre els dos grups d'estudi, però en la realització de la corba en viu, amb la mesura de la glucosa individualment s'observa diferències segons el sexe i a raó d'aquí es decideix analitzar-ho per sexes i grups. Com s'observa a la Figura 6 hi ha les concentracions de glucosa per cada grup i sexe en els diferents temps que va durar la corba. El que més crida l'atenció és que els mascles dels dos grups tenen una glicèmia basal i un comportament pràcticament igual, amb una glicèmia basal de 140mg/dL de glucosa en dejú, una mica per damunt dels límits superiors. Seguint la corba els mascles Spry1(-/-) tenen un pic més alt de glucosa als 40 minuts, però als 60 minuts tots dos baixen. Els mascles dels dos grups acaben



**Figura 6. Corba de tolerància a la glucosa. Separació per grups i sexes.** Determinació en sang total, en els temps 0, 20, 40, 60 i 120 minuts. Els resultats es mostren com a mitjana  $\pm$  DE.

la corba en valors superiors als nivells basals.

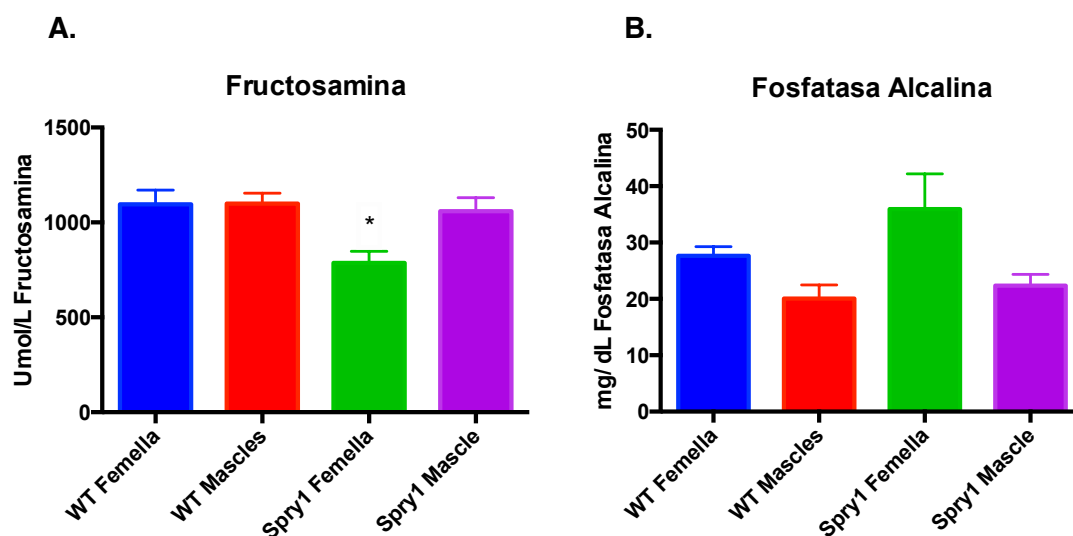
D'altra banda, s'observa les femelles tenen una glicèmia basal de 100mg/dL, és a dir, amb valors dins de la normalitat i el màxim pic de glucosa també és observat per les femelles Spry1(-/-), però no és un pic tant alt com el dels mascles.

S'agafa els valors de fructosamina i fosfatasa alcalina per veure com estan els controls dels pics de glucosa a curt termini.

Com a mesura per avaluar el control glucídic a llarg plaç és la fructosamina; en la Figura 7 és veu que els Spry1(-/-) femella tenen diferències significatives respecte als altres grups.

La fosfatasa alcalina, s'ha vist amb anterioritat que hi havia diferències mínimes entre els dos grups; aquí hi ha les mateixes dades però separant els grups per sexes i es veuen diferències significatives en les femelles Spry1(-/-) respecte als altres, sobretot amb els mascles que és amb

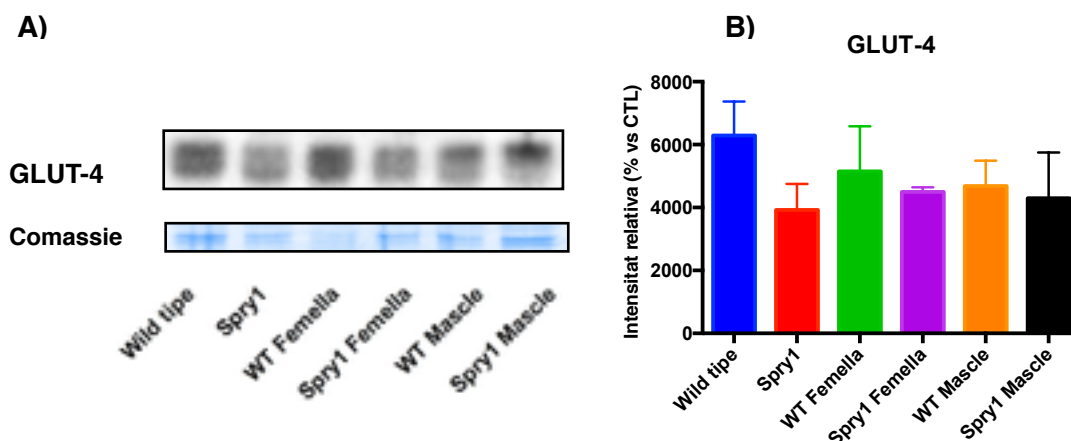
qui te les diferències. Les femelles WT, tenen també valors més alts que els mascles, tot i que no és significatiu.



**Figura 7. Paràmetres relacionats amb la glucosa sanguínia.** **A.** Concentració de fructosamina en plasma. (\* Estadísticament significatiu  $p < 0.05$  dels Spry femella respecte a la resta de grups. **B.** Concentració de Fosfatasa Alcalina en plasma. Els resultats es mostren com a mitjana  $\pm$  DE.

Les vies de senyalització són essencials per al correcte funcionament de l'organisme.

El GLUT-4, és la proteïna responsable de la incorporació de la glucosa al interior de les cèl·lules musculars principalment, és a dir, afavoreix el moviment de la glucosa del torrent sanguini cap als teixits. Tal com s'observa en la Figura 8, no hi ha diferències significatives entre els grups pel que fa al transport de glucosa en el múscul esquelètic. Tot i que de manera descriptiva podem observar com grup dels WT tenen més quantitat de GLUT-4 que els Spry1 (-/-).



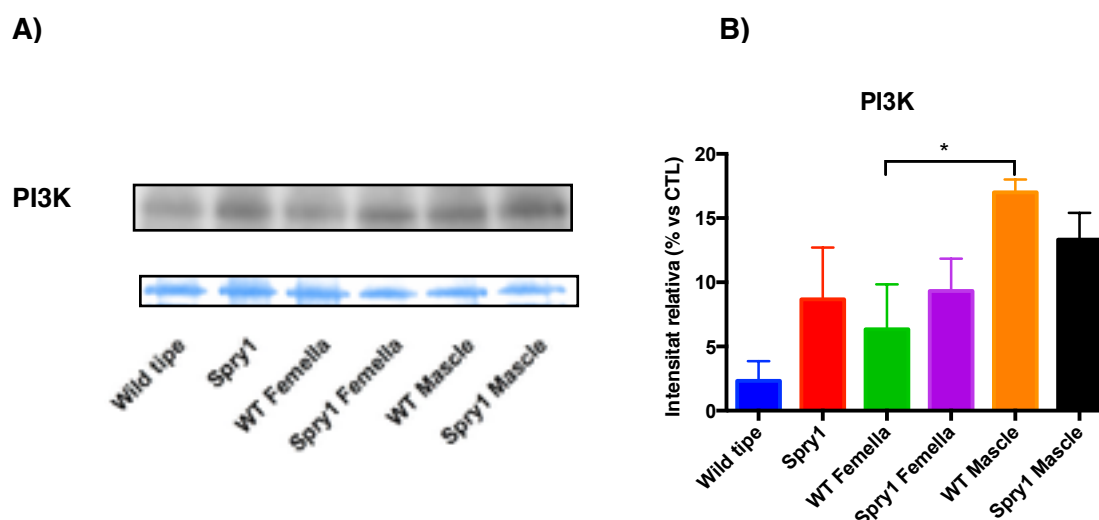
**Figura 8. Quantitat de proteïna transportadora de glucosa GLUT-4 en múscul esquelètic** **A)** Imatges de l'immunodetecció amb Western Blot amb GLUT-4 i del seu control de càrrega amb Blue Comassie. **B)** Anàlisi de la intensitat de la proteïna GLUT-4, relativa al seu control. Els resultats es mostren com a mitjana  $\pm$  DE.



L'activació de GLUT-4 està regulada per la cascada de senyalització que s'inicia en els receptors d'insulina com hem observat en la Figura 2, per tant és realitza la determinació de diferents proteïnes de la cascada de senyalització d'insulina per veure les possibles diferències en l'utilització de la glucosa com a substrat energètic.

En la Figura 9, és pot observar les diferències descriptives en PI3K entre el grup WT i Spry1(-/-), on el grup WT els seus valors són clarament inferiors respecte als Spry1(-/-).

Tot i que s'observa diferències significatives en el grup per sexe dels WT, on els mascles ens mostren una gran senyal respecte a les femelles; val a dir que els resultats més rellevants són els de les femelles WT on reflecteix a la disminució de senyal en el grup de WT totals.

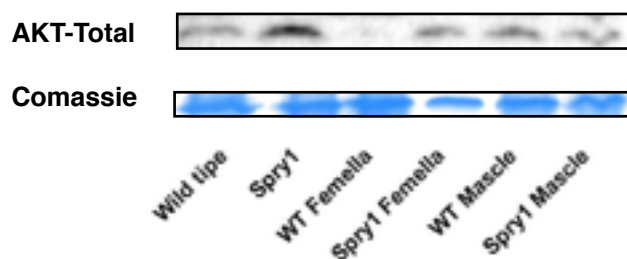


**Figura 9. PI3K en múscul esquelètic**

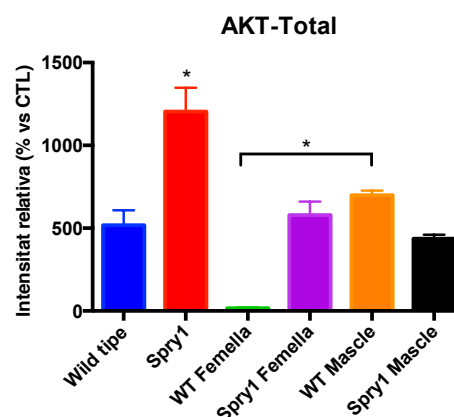
**A)** Imatges de la immunodetecció amb Western Blot de PI3K i del seu control de càrrega amb Blue Comassie. **B)** Anàlisi de la intensitat de la proteïna PI3K relativa al seu control. Amb diferències significatives ( $p < 0.05$ ) referents entre les variables del sexe en els Wild types. Els resultats és mostren com a mitjana  $\pm$  DE.

PI3K amb les seves subunitats p85 i p110 són precursors de AKT, mitjançant la fosforilació de PIP2 i PIP3. En la determinació de la senyal de AKT, com s'observa en la Figura 10 hi ha diferències clarament significatives entre el grups dels WT i dels Spry (-/-) ( $p = 0.0083$ ), on en el grup experimental la quantitat de AKT és clarament superior; però el que més destaca és la mínima quantitat de AKT que es torna en les femelles del grup WT, que és estadísticament significatiu respecte a la resta de grups per sexe. On sembla que tingui el mateix comportament que PI3K, que fa disminuir el valor de la proteïna el conjunt global dels WT.

A)



B)

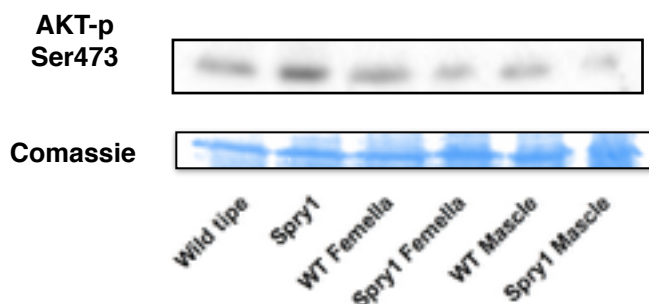


**Figura 10. Quantitat de proteïna AKT-Total en múscul esquelètic**

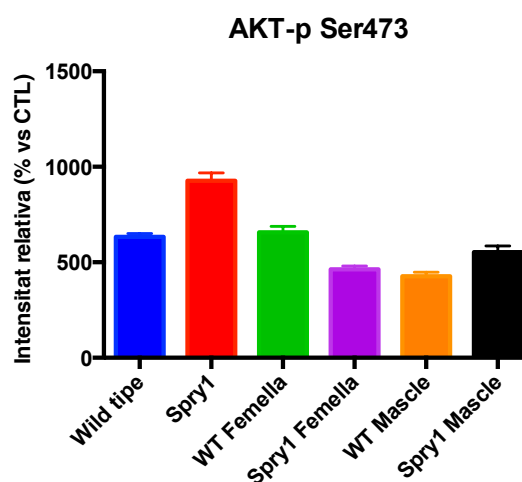
**A)** Imatges de l'immunodetecció amb Western Blot amb AKT-Total i del seu control de càrrega amb Blue Comassie. **B)** Anàlisi de la intensitat de la proteïna AKT-Total, relativa al seu control. Els resultats és mostren com a mitjana  $\pm$  DE. \* ( $p < 0.05$  respecte al grup WT Femella).

En AKT amb la doble fosforilació a la Serina 473, s'observa que tenen pràcticament el mateix comportament que AKT-Total tret dels WT femella, on aquí ho trobem augmentat respecte als altres grups separats per sexes, tot i que no hi ha diferències significatives.

A)



B)

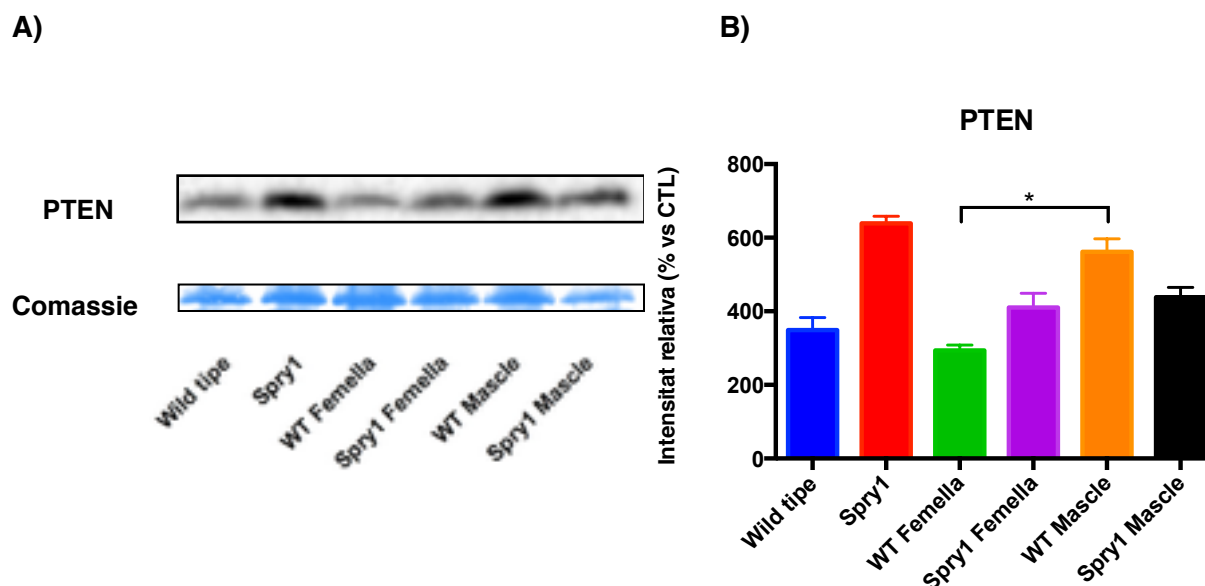


**Figura 11. Quantitat de proteïna fosforilada de AKT-Serina(473) en múscul esquelètic**

**A)** Imatges de l'immunodetecció amb Western Blot amb AKT-p (Ser473) i del seu control de càrrega amb Blue Comassie. **B)** Anàlisi de la intensitat de la proteïna AKT-p (Ser473) relativa al seu control. Els resultats és mostren com a mitjana  $\pm$  DE.

Per acabar, PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatasa), és un supresor tumoral que actua com una fosfatasa de doble especificitat i actua també com una lípid-fosfatasa que treu el grup fosfat del inositol; per tant antagonitza la ruta de senyalització de PI3K-AKT desfosforilant PIP3 per regenerar PIP2 i modulant la progressió del cicle cel·lular i la supervivència de la cèl·lula.

La pèrdua de la funció de PTEN, dóna lloc a gran nombre de carcinomes anomenats en l'apartat d'antecedents.



**Figura 12. PTEN en múscul esquelètic**

**A)** Imatges de l'immunodetecció amb Western Blot amb PTEN i del seu control de càrrega amb Blue Comassie. **B)** Anàlisi de la intensitat de la proteïna PTEN, relativa al seu control. Els resultats es mostren com a mitjana  $\pm$  DE. (\* Diferències significatives  $p < 0.05$  entre els dos sexe del grup WT).

Com podem observar en la Figura 12, hi ha diferències significatives entre els mascles i les femelles del grup control ( $p=0.0134$ ). D'altra banda, descriptivament observem que els grup Spry1(-/-) té uns valors que doblen gairebé el grup WT.

## 6. DISCUSSIÓ

En els ratolins knockout per Spry1(-/-) s'ha demostrat que la supressió d'aquest gen comporta un desenvolupament de neoplàsies i possibles canvis en el metabolisme energètic. Després de la ingesta d'una dieta alta en greixos durant 3 mesos; analitzem els canvis que s'han vist reflexats en la diferència de la ingesta dietètica, en el seu augment de pes, desnutrició i alteracions en el metabolisme glucídic.

L'experiment es va iniciar quant els ratolins tenien un mes i mig vida; on s'inicia amb el canvi de dieta a una dieta alta en greixos. Com s'observa a la Taula 2 els pesos inicials entre els WT i els Spry1(-/-) són força diferents sent en els Spry1(-/-) més elevat que ens els controls. En aquest punt, però no podem comprovar la ingesta de cada animal ja que estaven amb la mare i possiblement s'alletaven i també menjaven dieta normal; però podem intuir que des d'un inici els ratolins Spry1(-/-) ja tenen una major ingesta dietètica i per això tenen un pes més elevat en el punt inicial de l'experiment que podria ser degut a un augment metabòlic.

Amb aquests resultats és pot intuir que al haver-hi la supressió del gen Spry1(-/-) ja afecta al metabolisme energètic dels ratolins, tot i que en l'edat d'estudi no estigui desenvolupat clarament cap neoplàsia. Però com mostren diferents estudis, en certs tipus de càncer abans dels primers signes ja pot haver-hi un augment del metabolisme (Del Fabbro E et al. 2011).

Si ho comparem amb el pes final, els WT continuen pesant menys que els Spry1(-/-), tot i que en relació amb el pes inicial de l'estudi els WT han augmentat 7,2 grams de mitjana i els Spry1(-/-) només ho han fet 4,3 grams en les 12 setmanes de tractament dietètic. Però aquests resultats no serien vàlids si no ho relacionem amb l'ingesta quantitativa de dieta, on el grup dels Spry1(-/-) han realitzat una ingesta major de dieta 3.15 grams respecte als 2,96 grams del grup control; és a dir, tot i consumir més quantitat de grams i conseqüentment de quilocalories, el grup dels Spry1(-/-) té un augment menor de pes que els WT, tot i que les dades no són estadísticament significatives.

Tal com està descrit i s'ha pogut observar en el moment del sacrifici dels ratolins, els Spry1(-/-), degut a la seva supressió genètica, tenen una greu afectació nefrítica, on moren als 5 mesos de vida per aquesta patologia. Per tant és possible que a causa de la nefropatia hi hagi un augment de l'excreció i que hi hagi un augment dels requeriments energètics per cobrir les pèrdues a través dels sistema renal.

Com en aquest apartat s'ha vist diferències pel que fa al consum de dieta i com afecta aquesta ingesta en el pes, creiem convenient fer una avaluació de l'estat nutricional dels dos grups d'estudi per interpretar millor l'afectació metabòlica dels ratolins abans que hi apareguin una neoplàsia o si la nefropatia crònica que pateixen els hi afecta metabòlicament (Basson et al. 2006).

En relació a l'avaluació del estat nutricional s'han determinat diferents paràmetres bioquímics per a concloure resultats.

En primer lloc, es mesuren les proteïnes totals, la quantitat d'albumina, prealbumina i globulines en plasma; que serveixen per avaluar problemes nutricionals i dany renal i/o hepàtic; en aquest cas hi ha diferències significatives al respecte, com podem veure a la Figura 3 les proteïnes totals tot i que no estan alterades. Aquest resultat podria indicar que nutricionalment estan bé els dos grups.

Observant la Figura 3, en concentració d'albumina es veu que no hi ha pràcticament diferències el grup de la soca salvatge que té 4.5 g/dL d'albumina i els Spry1(-/-) tenen 4.3 g/dL. L'albumina és un indicador de desnutrició, i en aquest cas no es veu alterat, per tant no hi ha desnutrició; tot i que la mínima diferència s'atribueix, en el cas dels Spry1(-/-), a que els ronyons no tenen màxima funcionalitat i per tant perdríem albumina per l'orina al igual que altres proteïnes sanguínies. Per tant, amb aquests dos paràmetres de l'estat nutricional es pot afirmar que els dos grups d'estudi no estan en un estat de desnutrició, no han perdut massa muscular i no hi ha caquèxia.

En el perfil lipídic, a la Taula 4, el qual es un altre indicador de l'estat nutricional, ens indica que hi ha variacions entre els dos grups, però cap d'elles dona un resultat estadísticament significatiu.

El colesterol total en els dos grups estan elevats respecte els valors de normalitat, això s'atribueix al consum de dieta alta en greixos amb un 42% de lípids totals de la ingesta diària. Tot i que en estudis amb humans ens mostren que hi ha un augment de colesterol degut al TNF que inhibeix l'enzim lipoproteïna lipasa i queda el colesterol circulant al plasma en neoplàsies avançades (Seyfried, T. N., et al. 2014).

En els triglicèrids s'observa una disminució en els Spry1(-/-), no significativa, aquesta disminució pot ser degut a l'augment de les necessitats energètiques, per tant hi ha més consum i menys emmagatzematge.

Tant l'urea com la fosfatasa alcalina són paràmetres bioquímics que intueixen com està afectat el metabolisme proteic i també la funcionalitat renal, on cal tornar a ressaltar que els Spry1(-/-) moren als 5 mesos d'edat degut amb aquesta nefropatologia. (Basson et al. 2006)

La Figura 4 en els valors de la urea, mostra clarament com el grup Spry1(-/-) té uns valors molt elevats respecte als WT, havent diferències significatives amb  $p=0.0011$ . Com hi ha una afectació renal, on el filtrat glomerular no és eficient i per tant no hi ha eliminació dels productes de rebuig proteic; per tant és descarta que hi hagi un catabolisme proteic, ja que l'albumina i les proteïnes totals tenen valors normals.

La fosfatasa alcalina, però té uns valors normals en els dos grups i és un bon indicador de que la funcionalitat hepàtica és correcta.

Els HDL i LDL estan dins dels paràmetres normals tot i que els Spry1(-/-) tenen uns valors inferiors d'HDL i superiors de LDL que els WT, tot i estar dins de la normalitat són paràmetres desequilibrats, que poden produir un risc cardiovascular elevat.

D'altra banda, aquest resultats foren més concloents si haguéssim complementat l'experiment amb dos grups més que hagueren ingerit una dieta amb un percentatge de greix normal, així podríem veure realment l'afectació dels valors del perfil lipídic que són deguts al consum d'una dieta alta en greixos en els ratolins o hi ha realment una alteració en el metabolisme dels lípids.

Prosseguint amb l'estudi, la realització de corbes de tolerància a la glucosa per esbrinar l'estat del metabolisme glucídic dóna resultats curiosos i que fan pensar en que dins dels grups pugui haver-hi diferències segons el sexe. En la realització de la corba es van observar diferències entre els mascles i femelles de manera individual, per això a partir d'aquí s'ha analitzat com si fossin un total de 6 grups: WT, WT femella, WT mascle, Spry, Spry femella i Spry1 Mascle. En la Figura 5 de la corba de tolerància a la glucosa per grups s'observa com els dos grups es comporten pràcticament igual, però un cop analitzat per sexes, en la Figura 6 s'observa que els mascles dels dos grups es comporten de la mateixa manera al igual que les femelles. Els mascles tenen uns valors més alts en la glucosa basal i assoleixen un pic de glucosa superior i no es restableixen del tot els valors basal passades les dues hores de l'administració de glucosa. Aquestes diferències poden ser degudes a factors genètics dels Spry1 (-/-) i possiblement a factors relacionats amb el pes i l'ingesta calòrica; on els mascles han consumit més quantitat de calories, d'una dieta hipergrassa al dia, tenen un pes major i a raó d'això poc a poc és vagi perden sensibilitat a la insulina i puguin arribar a ser insulinoresistents, com s'ha demostrat en altres experiment en el mateix laboratori; on es va demostrar que administrant una dieta alta en greixos durant 4 mesos podem induir als ratolins resistència a la insulina.

Aquests paràmetres de la glucosa en diferents punts d'administració de carbohidrats simples, s'han de complementar amb la determinació de la Fructosamina, paràmetre que ens mesura a llarg termini de 2-3 setmanes, si el control de la glucèmia dels ratolins és correcte. Observant la Figura 8, és veu diferències significatives en les femelles Spry1(-/-) respecte a tots els altres grups. Això significa que les Spry1(-/-) no han tingut pics de glucosa tant als com la resta dels grups, pot ser degut a que tenen un metabolisme accelerat i la glucosa que entra al torrent sanguini és ràpidament absorbida o bé que el dany renal també influeix en el metabolisme glucídic. Per valorar aquests canvis en la glucosa, és va determinar la funcionalitat de la cascada de la senyalització de la insulina.

La glucosa, com s'ha dit amb anterioritat és la principal font d'energia de tot l'organisme, i per això és tant important el seu estudi i esbrinar les seves alteracions. L'estudi de les proteïnes de vies metabòliques, és de gran ajuda per veure el lloc exacte de la senyalització que hi ha el problema a tractar. En aquest cas s'ha començat pel GLUT-4, proteïna transportadora encarregada que la glucosa travessi la membrana plasmàtica; com observem a la Figura 8, no hi ha diferències entre els grups i demostra l'expressió de GLUT-4 és funcional i sembla que la glucosa entra correctament i pot ser metabolitzada per glucòlisi, síntesi de glucogen o síntesi d'àcids grassos. En el cas que hi hagués una reducció de l'expressió seria significatiu de resistència a la insulina.

Com hem dit la font d'energia a l'organisme és la glucosa i l'entrada de glucosa a la cèl·lula es controlada per múltiples senyals que s'activen després de la interacció de la insulina amb el seu receptor. Totes les respostes abans d'aquesta interacció amb el receptor són mediades com a conseqüència de l'activació de diferents vies de transducció. Aquestes inclouen l'activació del receptor PI3K, on aquesta activació fa que s'activin els IRS.

S'ha analitzat la quantitat d'expressió de PI3K en múscul esquelètic en els diferents grups i com s'observa en la Figura 9, hi ha diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre els WT femella que tenen un valor molt més baixos que els seus respectius mascles WT. En la resta de grups els seus paràmetres són diferents descriptivament, s'observa com els WT tenen valors molt inferiors als KO per Spry1(-/-). Però el més rellevant és la diferència descriptiva que hi ha entre el WT i Spry1(-/-) on el WT tenen molt poca expressió de PI3K respecte al Spry1(-/-), és a dir, sembla ser que els WT tenen menys captació de glucosa a través dels IRS o bé que aquesta captació és molt més ràpida que en els Spry1(-/-) i quant s'observa, PI3K ja s'ha desactivat i ha activat la següent proteïna de la via metabòlica.

La PI3K activada fosforil·la fosfolípids de membrana, i el seu producte es el PIP2 i la posterior fosforilació de PIP3 activarà la proteïna quinasa AKT. Amb la continuació de la ruta és prossegueix amb l'anàlisi dels grups d'estudi; com s'observa en la Figura 10 de AKT hi ha diferències clarament significatives de grup de les femelles del WT amb la resta dels grups, amb una diferència significativa ( $p = 0.008$ ) entre els grups totals. De totes maneres el grup WT Femelles és clarament inferior a la resta en expressió de AKT-Total. Ha hagut una major estimulació insulínica per part del grup dels Spry1(-/-) i per això es veu una sobreexpressió en relació al WT. Però és estrany que no es veu cap diferència respecte del GLUT-4, Figura 8, ja que quant AKT està activada comporta una translocació de les molècules de GLUT-4 a la superfície cel·lular que comporta un increment del ingrés de glucosa sobretot en múscul esquelètic.

En la determinació de la AKT fosforilada a l'aminoàcid Serina 473, l'estimulació insulínica ha estat pràcticament igual en tots els grups d'estudi, sense haver-hi diferències significatives, però

descriptivament si que podem dir que AKT-p (Ser 473) està augmentada en el grup dels Spry1(-/-).

Pel que fa a les alteracions en la ruta de PI3K, PTEN i AKT en context tumors, val a dir que s'han descrit diferents anormalitats associades a tumors. PTEN té la funció de desfosforilar PIP3 per regenerar PIP2, tanmateix s'ha observat un guany en funció o amplificació de les subunitat quinases del PI3K en la seva sobrepressió, també s'inclou guanys de funció a les subunitats de PI3K, mutacions i amplifícacions de les diferents isoformes de AKT. Per tant en PTEN encara no està clara la seva imposició en aquest tema. Pel que fa als nostres resultats no observem diferències significatives entre els grups d'estudi i les seves diferències no ens mostren cap conclusió al respecte. Tot i que per bibliografia i per observacions hem comprovat com els knockout per Spry1 (-/-) tenen desenvolupaments neoplàsics.

En resum pel que va la ruta metabòlica de la senyalització a la insulina, el grup dels knockout per Spry1(-/-) tenen una major expressió de les seves proteïnes; tot i que no hi ha suficients diferències per suggerir que hi ha una alteració en la sensibilitat a la insulina, per tant podem suggerir que no hi ha diferències en el metabolisme energètic i les diferències observades poden ser derivats de la pèrdua energètica deguda a la nefropatia congènita.



## 7. CONCLUSIONS

1. Els ratolins Knockout per Spry1 (-/-) tenen un consum més elevat d'ingesta dietètica i un menor augment de pes respecte els ratolins Wild Type.
2. En l'administració de la dieta alta en greixos durant 3 mesos no hi ha inducció a resistència a la insulina en ratolins Spry1(-/-).
3. Els ratolins knockout per Spry1 (-/-) i WT no presenten cap signe de desnutrició.
4. El consum d'una dieta alta en greixos comporta un augment dels nivells de colesterol total en els knockout per Spry1 (-/-) com els WT.
5. El knockout per Spry1(-/-) no tenen una major expressió de les seves proteïnes en ruta metabòlica de la senyalització a la insulina. (PI3K, AKT-Total, AKT-p (Ser473)).



## 8. BIBLIOGRAFIA

- Basson, M. A., Akbulut, S., Watson-Johnson, J., Simon, R., Carroll, T. J., Shakya, R., Gross, I., Martin, G. R., Lufkin, T., McMahon, A. P., et al. (2005). Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Dev Cell* 8, 229-239.
- Basson, M. A., Watson-Johnson, J., Shakya, R., Akbulut, S., Hyink, D., Costantini, F. D., Wilson, P. D., Mason, I. J., and Licht, J. D. (2006). Branching morphogenesis of the ureteric epithelium during kidney development is coordinated by the opposing functions of GDNF and Sprouty1. *Dev Biol* 299, 466-477.
- Benjamin, D. I., Cravatt, B. F., & Nomura, D. K. (2012). Global Profiling Strategies for Mapping Dysregulated Metabolic Pathways in Cancer. *Cell Metabolism*, 16(5), 565–577
- Carriere, I., Dupuy, A.-M., Lacroux, A., Cristol, J.-P., Delcourt, C., & the POLA Study Group. (2008). Biomarkers of inflammation and malnutrition associated with early death in healthy elderly people. *Journal of the American Geriatrics Society*, 56(5), 840–846.
- Cavalieri, E. L., & Rogan, E. G. (2011). Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(0), 169–180
- Dang, C. V., Le, A., & Gao, P. (2009). MYC-induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(21), 6479–6483.
- Del Fabbro E, Hui D, Dalal S, Dev R, Noorhuddin Z, Bruera E. Clinical Outcomes and Contributors to Weight Loss in a Cancer Cachexia Clinic. *Journal of Palliative Medicine*. 2011;14(9): 1004-1008.
- Dev, R., Hui, D., Chisholm, G., Delgado-Guay, M., Dalal, S., Del Fabbro, E., & Bruera, E. (2015). Hypermetabolism and symptom burden in advanced cancer patients evaluated in a cachexia clinic. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 6(1), 95–98.
- Fong, C. W., Chua, M. S., McKie, A. B., Ling, S. H., Mason, V., Li, R., Yusoff, P., Lo, T. L., Leung, H. Y., So, S. K., and Guy, G. R. (2006). Sprouty 2, an inhibitor of mitogen- activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 66, 2048-2058.

- Frank, M. J., Dawson, D. W., Bensinger, S. J., Hong, J. S., Knosp, W. M., Xu, L., Balatoni, C. E., Allen, E. L., Shen, R. R., Bar-Sagi, D., et al. (2009). Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas. *Blood* 113, 2478-2487.
- George, S., Rochford, J.J., Wolfrum, C., Gray, S.L., Schinner, S., Wilson, J.C., Soos, M.A., Murgatroyd, P.R., Williams, R.M., Acerini, C.L., Dunger, D.B., Barford, D., Umpleby, A.M., Wareham, N.J., Davies, H.A., Schafer, A.J., Stoffel, M., O'Rahilly, S. & Barroso, I. 2004, "A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2", *Science* (New York, N.Y.), vol. 304, no. 5675, pp. 1325-1328.
- GONZALO BENITO, Hugo. *Modulación de vías de señalización celular que controlan el metabolismo energetico por compuestos bioactivos presentes en soja y té verde: Implicaciones para la prevención del síndrome metabólico*. Dirigida per Jordi Boada. Tesis doctoral inédita. Universitat de Lleida, Facultat de Medicina, 2012.
- Koom, W. S., Ahn, S. D., Song, S. Y., Lee, C. G., Moon, S. H., Chie, E. K., ... Keum, K. C. (2012). Nutritional status of patients treated with radiotherapy as determined by subjective global assessment. *Radiation Oncology Journal*, 30(3), 132–139.
- Macià, A., Gallel, P., Vaquero, M., Gou-Fabregas, M., Santacana, M., Maliszewska, A., ... Encinas, M. (2012). Sprouty1 is a candidate tumor suppressor gene in medullary thyroid carcinoma. *Oncogene*, 31(35), 3961–3972.
- Masoumi-Moghaddam, S., Amini, A., & Morris, D. L. (2014). The developing story of Sprouty and cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 33(2-3), 695–720.
- Mullen, J. L. (1994). Hypermetabolism and advanced cancer. *Annals of Surgery*, 219(4), 323–324.
- Noch, E., & Khalili, K. (2012). Oncogenic Viruses and Tumor Glucose Metabolism: Like Kids in a Candy Store. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(1), 14–23
- Roberts, C. K., Hevener, A. L., & Barnard, R. J. (2013). Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 1–58

Schutzman JL, Martin GR. Sprouty genes function in suppression of prostate tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(49):20023-20028.

Seyfried, T. N., Flores, R. E., Poff, A. M., & D'Agostino, D. P. (2014). Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis*, 35(3), 515–527

Zhang, Z., Liu, C., Gan, Z., Wang, X., Yi, Q., Liu, Y., ... Wang, J. (2013). Improved Glucose-Stimulated Insulin Secretion by Selective Intraislet Inhibition of Angiotensin II Type 1 Receptor Expression in Isolated Islets of db/db Mice. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 319586.

---